

中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this
office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2003 年 06 月 10 日
Application Date

申請案號：092115661
Application No.

申請人：財團法人台灣動物科技研究所
Applicant(s)

局長

Director General

蔡練生

發文日期：西元 2003 年 9 月 18 日
Issue Date

發文字號：09220932270
Serial No.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：

※ 申請日期：

※IPC 分類：

壹、發明名稱：(中文/英文)

自動物乳汁中分離蛋白質之方法

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)(簽章)

財團法人台灣動物科技研究所

代表人：(中文/英文)(簽章) 翁仲男

住居所或營業所地址：(中文/英文)

苗栗縣竹南鎮科東二路 52 號

國 籍：(中文/英文) 中華民國/R.O.C.

電話/傳真/手機：

E-MAIL：

參、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文) ID：

1. 顏重河 ID：B120593508

2. 林美玲 ID：K220735284

住居所地址：(中文/英文)

1.2. 苗栗縣竹南鎮科東二路 52 號

國 籍：(中文/英文) 中華民國/R.O.C.

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

伍、中文發明摘要：

本發明係關於一種自動物乳汁中分離酪蛋白之方法，主要係將動物乳汁經過前處理去脂後，將前述去脂的乳汁通過一陶瓷過濾膜，以除去乳汁中的酪蛋白。藉由分離乳汁中之酪蛋白之前處理步驟後再配合其他純化步驟，以獲得純度更高之標的蛋白質。

陸、英文發明摘要：

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 一 ）圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係提供一種利用陶瓷過濾膜自動物乳汁中分離酪蛋白(casein)之方法，及其後續之應用。

【先前技術】

人類蛋白質藥物例如：胰島素(Insulin)，紅血球生長素(Erythropoietin, EPO)，以及人類生長激素(Human growth hormon, HGH)等在臨床上已被使用多年且藥效良好，然而在過去這類藥物的來源只能由天然的血液、組織、或器官獲取，因此產量甚低且價格甚高，往往不是一般人所能負擔。近幾年來，由於生物技術之進步，人類已可利用基因重組技術來大量化生產此類藥物，也因此人類蛋白質藥物之生產成本亦大幅降低。

在各種製造重組蛋白質藥物的系統中，基因轉殖動物由於其體內可大量生產所欲之目標蛋白質，故較酵母菌或動物細胞更具商業化規模與潛力。藉由將重組基因轉殖到哺乳動物體內，由其所分泌的乳汁中可純化出大量重組之目標蛋白質，然而，乳汁是一種複雜的生物膠質(bio-colloid)，其成分的複雜性相當於血漿的組成，因而造成純化處理上的困難。

一般而言，基因轉殖動物乳汁中之內源(endogenous)蛋白質成分，並不會因為含有重組之目標蛋白質而與非基因轉殖動物而有所差異，故在基因轉殖動物的乳汁中所表現的重組之目標蛋白質的量會影響其純化的難易度，理論上，外來重組基因的表現量越大越好，但對一些構造較複雜的蛋白質因考慮到修飾的問題，其表現量都不會設計的太高。

乳汁中的蛋白質成分主要是酪蛋白(casein)，它的含量超過總蛋白質量 50%，因此在蛋白質的純化過程中酪蛋白常成為主要的不純物

來源。酪蛋白以微膠粒(micelle)的狀態存在乳汁中，以豬乳為例，酪蛋白和膠態磷酸鈣結合成平均直徑為 133nm 的粒子懸浮在乳汁中；另外，纖維蛋白分解酵素(plasmin)也是乳汁中含量豐富的成分，它能水解多肽鏈中的 Lys-X 和 Arg-X，其水解活性的最佳條件是在 pH 值 7.5 和 37°C，因此在乳樣採集之後，如何避免纖維蛋白分解酵素的影響，也是考慮的重點。纖維蛋白分解酵素在乳汁中大都以結合在酪蛋白微膠粒的形式存在，所以，自乳汁中分離重組蛋白質，最先要考慮的是除去酪蛋白微膠；但在實際操作的狀況，它常常是一個不容易操作和引起困擾的步驟。

去除酪蛋白微膠現有的方法有：第一種方法係降低乳汁的 pH 值至 4.6 以下，使乳汁分離成酸凝乳沉澱以及含有可溶性重組蛋白質的乳清，然其缺點是 pH 值的改變常會造成蛋白質構造的破壞，使其失去活性；另外，若重組蛋白本身是酸性蛋白質，也會在此 pH 值條件下沉澱而無法分離出來；再者，酸性條件會使唾液酸 (sialic acid) 殘基從糖蛋白中被移除，導致蛋白質組成改變。第二種方法係使用聚乙二醇(PEG)來使酪蛋白微膠粒沉澱，然其先決條件是做為標的物之重組蛋白不會被 PEG 沉澱。這兩個方法除了以上的限制之外，一般酪蛋白微膠粒在不做處理的狀態下，需要以超高速離心機的離心力才能將之沉澱，這使得在分離沉澱物和上清液時需要高離心力的作用，於大量操作時很不方便。第三種方法係以 EDTA 或檸檬酸鹽將酪蛋白微膠粒溶解，之後以超過濾法進行過濾。超過濾法是製造生物製劑（醫藥用蛋白、血清、抗體等）常用的步驟，主要的功能是除去生物製劑中的微生物及病毒，或是除去溶液的小分子鹽類。由於乳汁是一種複雜的生物膠質，在進行超過濾時很容易堵塞超過濾膜，成為目前極需克服目前的技術瓶頸。

【發明內容】

有鑒於前述自動物之乳汁中純化目標蛋白質時，常發生酪蛋白不易去除的問題，本發明係提供一種自動物乳汁中分離酪蛋白之方法，係包括將動物乳汁於 10 至 20 磅/平方英吋 (psi) 之流速壓力與特定 pH 值條件下以一不帶電荷之過濾膜進行過濾，以分離乳汁中之酪蛋白，其中前述之過濾膜可為陶瓷過濾膜。前述之陶瓷過濾膜其孔徑較佳係介於 0.1 微米 (μm) 至 0.44 微米之間，更佳係介於 0.14 微米至 0.2 微米之間。

前述方法所述之乳汁係可為全乳、去脂乳或乳清。前述之過濾方式係為滲濾 (diltration) 方式。前述之特定 pH 值係可根據欲純化之標的蛋白質之物理特性或化學特性而決定。

前述方法係可視需要加入一預處理步驟以去除乳脂，前述之預處理步驟係包括一離心步驟。

前述之動物可為未經基因轉殖之動物或基因轉殖動物。

本發明亦提供一種由動物乳汁中純化標的物質之方法，係利用前述之方法去除乳汁中之酪蛋白，獲得更純之標的物質例如：胜 或蛋白質。

本發明之另一目的係提供一種由動物乳汁中純化標的物質之方法，係包括下列步驟：(a) 將動物乳汁以緩衝溶液調至特定之 pH 值；(b) 將 (a) 步驟所得之特定 pH 值之動物乳汁於特定流速壓力下通過第一過濾膜，以分離乳汁中之酪蛋白並收集第一濾出液；以及 (c) 將前述第一濾出液於特定流速壓力與特定 pH 值條件下通過第二過濾膜，以濃縮標的物質並收集第二濾出液。

前述之標的物質可為胜 或蛋白質，前述之蛋白質可為人類第九凝血因子。

前述之第一過濾膜為陶瓷過濾膜，前述之陶瓷過濾膜之孔徑較佳係介於 0.1 微米至 0.44 微米之間，更佳係介於 0.14 微米至 0.2 微米之間。

前述之第二過濾膜為聚砵 (polysulfone) 過濾膜，其孔徑較佳係 30kD。

前述之步驟 (b) 與步驟 (c) 之特定流速壓力係介於 10 至 20 磅/平方英吋之間，且前述之步驟 (b) 與步驟 (c) 係為滲濾方式。

前述之步驟 (a)、步驟 (b) 與步驟 (c) 之特定 pH 質較佳係介於 pH 值 5.0 至 6.5 之間。

前述之方法，係可視需要於步驟 (c) 之後進一步加入層析步驟純化出標的物質，前述之層析步驟係可為鹽溶法 (salt in)、鹽析法 (salt out)、膠體過濾法 (gel filtration)、離子交換層析法 (ion exchange chromatography) 或親和層析法 (affinity chromatography)。

前述之方法，係可視需要在步驟 (a) 之前加入一預處理步驟以去除乳脂，前述之預處理步驟係包括一離心步驟。

前述之乳汁係可為全乳、去脂乳或乳清，前述之動物可為未經基因轉殖之動物或基因轉殖動物。

本發明之再一目的係提供一種自動物乳汁中純化人類第九凝血因子之方法，至少包含下列步驟：(a) 將動物乳汁以緩衝溶液調至 pH 值 5.0 至 6.5；(b) 將 (a) 步驟所得之特定 pH 值之動物乳汁於 10 至 20 磅/平方英吋流速壓力下通過一陶瓷過濾膜，以分離乳汁中之酪蛋白並收集第一濾出液；以及 (c) 將前述第一濾出液於 10 至 20 磅/平方英吋流速壓力與 pH 值 5.0 至 6.5 條件下通過聚砵過濾膜，以濃縮人類第九凝血因子並收集第二濾出液。

前述之方法，係可視需要在步驟 (a) 之前加入一離心步驟以去除乳脂；亦可視需要於步驟 (c) 之後進一步加入層析步驟純化出人類第九凝血因子。

【實施方式】

以下係透過以純化人類第九凝血因子之實施例更進一步說明本發明之技術特徵與優點，但本發明之技術不限於純化此蛋白質。

如第一圖所示，純化人類第九凝血因子之操作流程係包括去脂 (defat)、過濾濃縮 (ultrafiltration & diafiltration) 與層析。

I、去脂

採集 200 毫升之含有人類第九凝血因子基因的基因轉殖豬之乳汁，乳汁中含有於乳腺表現之人類第九凝血因子之重組蛋白，將乳汁以 3000 x g 的離心力在 4°C 中離心 20 分鐘後，除去上層的乳脂，接著進行下一個純化步驟或保存於 -80°C 冰箱備用。

II、過濾濃縮

將所得的膠態溶液以緩衝液調到所欲之 pH 值，再通入孔徑 0.14 微米的陶瓷過濾膜過濾以滲濾 (diafiltration) 的方式，在流速壓力指數不超過 10 磅/平方英吋的情況下，一邊過濾去脂豬乳，一邊以 50mM，pH 值 7.4 的磷酸鹽緩衝液透析，將豬乳中的酪蛋白微膠粒、大分子蛋白質及鈣質除去，如此可得到一澄清微黃色的濾出液。

將此濾出液再通過孔徑 30kD 的聚砜 (polysulfone, PS) 超過濾膜，同樣以滲濾 (diafiltration) 的方式，在流速壓力指數 10 至 20 磅/平方英吋的情況下，一邊將小分子過濾掉，一邊以 50mM，pH 值 7.4 的 tris-HCl 緩衝液透析。待透析完成後進行濃縮，即可得到一澄清透明含有人類第九凝血因子的濾出液。

III、層析

A. 離子交換層析 (Ion-exchange chromatography)

將所得之含有人類第九凝血因子之 50 mM，pH 值 7.4 tris-HCl buffer 濾出液以流速 1L/hr 的速度流經陰離子層析凝膠 STREAMLINE Q-XL column 後，先後以含有不同 NaCl 濃度 (0.1N, 0.2N, 0.3N, 0.4N, 0.5N) 之 50mM，pH 值 7.4 之 tris-HCl 緩衝液當洗出液 (elution buffer)，收集不同鹽濃度之蛋白質分液 (fraction)，經 280nm 紫外光分析後可看到不同鹽濃度的蛋白質分液有不同的蛋白質分佈，將每個蛋白質分液取樣進行血液凝固活性分析、凝膠電

泳分析 (SDS page) 及西方點漬法 (Western Blotting); 其中先以血液凝固活性分析儀, 分析具有活性之人類第九凝血因子所分佈之分液 (fraction), 將此分液所收集之具有活性之人類第九凝血因子溶液以 50mM, pH 值 7.4 之 tris-HCl 緩衝液當作去鹽溶液 (desalt solution) 以去除 NaCl 及濃縮, 之後進行下一個親和層析步驟。

B. 親和層析 (Affinity chromatography)

將前述 A 步驟所得到具有活性之人類第九凝血因子之 50 mM, pH 值 7.4 tris-HCl buffer 以流速 15ml/mins 的速度流經 heparin sepharose 6 FF column 後, 同樣以上述 STREAMLINE Q-XL column 之流洗條件收取不同 NaCl 濃度下所得到之蛋白質。

如同前述之血液凝固活性分析儀, 分析具有活性之人類第九凝血因子所分佈之分液 (fraction)。

去鹽及濃縮後所得到高純度人類第九凝血因子溶液, 一部分加入保護劑 (10mmole/L 組氨酸 (histidine)、0.26mmole/L 甘氨酸 (glycine)、1% 蔗糖 (sucrose) 以及 0.005% polysorbate-80, 中性 pH 值), 體積以 1:1 分管保存於 -80°C, 另一部分未加保護劑則同樣保存於 -80°C, 以便之後進行定性、定量分析。

實驗結果:

比較不同材質與不同孔徑的過濾膜進行試驗的結果如表 1:

表 1

過濾膜材質	方法	過濾膜孔徑	濾出中的酪蛋白微膠粒	濾出中的人類第九凝血因子
聚砜過濾膜 (Polysulfone)	超過濾	30KD	無	無
		100KD	無	少量
		300KD	無	少量

		500KD	無	無
陶瓷過濾膜	超過濾	30KD	無	無
	微過濾	0.14 μ m	無	顯著的量
		0.20 μ m	無	顯著的量
		0.45 μ m	酪蛋白微膠粒出 現在濾液中	顯著的量

註：酪蛋白微膠粒以溶液之澄清度及 SDS-PAGE 上酪蛋白色帶(band)強度觀察；人類第九凝血因子以西方墨點法觀察。”無”代表在以上偵測法無法測得，”少量”代表濾出量少於總量的 5%，”顯著的量”代表濾出量大於總量的 5%。

將乳汁在 pH 值 5.5 之條件下通過 0.14 微米之第一陶瓷過濾膜，將含有同量蛋白質之原乳汁、未通過陶瓷過濾膜部分與通過陶瓷過濾膜之部分，分別進行電泳分析比較其蛋白質組成，其結果如第二圖所示，其中 W_0 係為原乳汁、 W_f 表示未通過超過濾膜之乳汁、 C_0 表示通過超過濾膜的蛋白質組成。由圖中顯示，在通過陶瓷過濾膜的蛋白質成分 (C_0)，可以發現在分子量 30KDa 附近的酪蛋白分子明顯的減少至幾乎消失。將電泳膠片上的蛋白質轉漬到 PVDF 膜上，以抗人類第九凝血因子的抗體進行免疫染色，結果如第三圖所示。大部分的人類第九凝血因子都在濾過液中，顯示本發明方法可確實分離乳汁中的酪蛋白而保留人類第九凝血因子。

第一過濾膜（陶瓷過濾膜）的濾過液經第二過濾膜（聚砜過濾膜）濃縮後再將緩衝液成分轉換成 50mM Tris-HCl (pH 值 7.4)，將此蛋白質溶液通入 Sepharose Q 管柱，管柱以 50mM Tris-HCl (pH 值 7.4) 溶液沖洗至無蛋白流出，再以含 NaCl 的原緩衝液沖洗出含人類第九凝血因子的部分，收集此部分以 50mM Tris-HCl (pH 值 7.4) 溶液稀釋後，再通入 Heparin-Sepharose 管柱，以含 NaCl 的原緩衝液沖洗出純化的人類第九凝血因子。結果如第四圖所示。

pH 值對回收率的影響：

另外，比較不同 pH 值條件下以 0.14 微米陶瓷過濾膜進行試驗所得之人類第九凝血因子之最終回收率結果如表 2：

表 2

乳汁之 pH 值	人類第九凝血因子回收比(%)
pH 8.4	5
pH 7.4	9
pH 6.0	40
pH 5.5	55
pH 5.2	52

註：回收比為 (純化後的人類第九凝血因子的總量)/(原去脂乳汁中人類第九凝血因子的總量)X100%

結果討論：

乳汁中酪蛋白含量超過總蛋白質的 50%，在蛋白質的純化過程中，目標蛋白質(在此為人類第九凝血因子)的量和酪蛋白比較，相對地非常的稀少，因此酪蛋白可能成為主要的不純物來源，所以將酪蛋白和目標蛋白質分離係為純化過程必須的工作。

習知去除酪蛋白之方法包括將乳汁 pH 值調至 4.2 或以下，或是加入 PEG 之後再離心(12,000 x g; 60 分)等，雖然可使酪蛋白微膠粒形成沈澱物，然人類第九凝血因子在此條件下也同時沈澱物下來，故無法將酪蛋白與人類第九凝血因子分離。此外，若將乳汁的 pH 值調至 5.5，以 48,000 x g 離心 2 小時，乳汁可分離成較澄清的上層以及含有酪蛋白微膠粒的下層，兩層的體積比大約是 1：1，然而仍有 70% 的人類第九凝血因子存在於下層中，原因可能為部分人類第九凝血因子與酪蛋白微膠粒結合所導致，故此方法僅能將酪蛋白和部分的人類第九凝血因子分開，且需要高速的離心力，因此不適合用於大量生產時的操作。

本發明之實驗係使用 0.14 微米和 0.20 微米的陶瓷膜分離酪蛋白微膠

粒和人類第九凝血因子，結果發現利用此兩種孔徑的陶瓷膜，可以得到大量的人類第九凝血因子，顯示人類第九凝血因子可輕易通過此兩種孔徑的陶瓷膜，並且於過濾液中未發現酪蛋白微膠粒的存在，表示酪蛋白微膠粒不會通過陶瓷過濾膜。

上述實施例係用來詳細敘述本發明之內容，惟不宜用以限制本發明於所揭示之特定形式。本發明之範疇係以所附之申請專利範圍所定義為基準，並且包括不脫離本發明之精神與範圍之所有修飾與類似之變更。

【圖式簡單說明】

第一圖係顯示利用本發明之方法純化人類第九凝血因子之流程。

第二圖係顯示使用本發明之方法分離酪蛋白之功效。

第三圖係顯示利用本發明之方法分離酪蛋白後，於濾出液中仍保留大量人類第九凝血因子。

第四圖係顯示純化後所得到的人類第九凝血因子。

拾、申請專利範圍：

- 1.一種自動物乳汁中分離酪蛋白之方法，係包括將動物乳汁於 10 至 20 磅/平方英吋之流速壓力與特定 pH 值條件下通過一不帶電荷之過濾膜進行過濾，藉以分離乳汁中之酪蛋白。
- 2.如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中前述之過濾膜為陶瓷過濾膜。
- 3.如申請專利範圍第 2 項所述之方法，其中前述之陶瓷過濾膜之孔徑係介於 0.1 微米至 0.44 微米之間。
- 4.如申請專利範圍第 3 項所述之方法，其中前述之陶瓷過濾膜之孔徑係介於 0.14 微米至 0.2 微米之間。
- 5.如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中前述之乳汁為全乳、去脂乳或乳清。
- 6.如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中前述之過濾方式係為滲濾方式。
- 7.如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中前述之特定 pH 值係可根據欲純化之標的蛋白質之物理特性或化學特性而決定。
- 8.如申請專利範圍第 1 項所述之方法，係可在前述過濾方法之前加入一預處理步驟以去除乳脂。
- 9.如申請專利範圍第 8 項所述之方法，其中前述之預處理步驟係包括一離心步驟。
- 10.如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中前述之動物為未經基因轉殖之動物或基因轉殖動物。
- 11.一種由動物乳汁中純化標的物質之方法，係利用申請專利範圍第 1 項至第 9 項之任一項所述之方法，以去除乳汁中之酪蛋白。
- 12.如申請專利範圍第 11 項所述之方法，其中前述之標的物質為胜 或蛋白質。
- 13.一種由動物乳汁中純化標的物質之方法，係包括下列步驟：
 - (a) 將動物乳汁以緩衝溶液調至特定之 pH 值；

- (b) 將 (a) 步驟所得之特定 pH 值之動物乳汁於特定流速壓力下通過一第一過濾膜，以分離乳汁中之酪蛋白並收集第一濾出液；以及
- (c) 將前述第一濾出液於特定流速壓力與特定 pH 值條件下通過第二過濾膜，以濃縮標的物質並收集第二濾出液。
- 14.如申請專利範圍第 13 項所述之方法，係可於步驟 (c) 之後進一步加入層析步驟以純化出標的物質。
- 15.如申請專利範圍第 13 項或第 14 項所述之方法，其中前述之標的物質為胜 或蛋白質。
- 16.如申請專利範圍第 15 項所述之方法，其中前述之蛋白質為人類第九凝血因子。
- 17.如申請專利範圍第 13 項所述之方法，其中前述之第一過濾膜為陶瓷過濾膜。
- 18.如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中前述之陶瓷過濾膜之孔徑係介於 0.1 微米至 0.44 微米之間。
- 19.如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中前述之陶瓷過濾膜之孔徑係介於 0.14 微米至 0.2 微米之間。
- 20.如申請專利範圍第 13 項所述之方法，其中前述之第二過濾膜為聚砜過濾膜。
- 21.如申請專利範圍第 20 項所述之方法，其中前述之聚砜過濾膜之孔徑為 30kD。
- 22.如申請專利範圍第 13 項所述之方法，其中前述之步驟 (b) 與步驟 (c) 之特定流速壓力係介於 10 至 20 磅/平方英吋之間。
- 23.如申請專利範圍第 13 項所述之方法，其中前述之步驟 (b) 與步驟 (c) 為滲濾方式。
- 24.如申請專利範圍第 13 項所述之方法，其中前述之步驟 (a)、步驟 (b) 與步驟 (c) 之特定 pH 值較佳係介於 pH 值 5.0-6.5 之間。
- 25.如申請專利範圍第 14 項所述之方法，其中前述之層析步驟係為鹽溶法

(salt in)、鹽析法 (salt out)、膠體過濾法 (gel filtration)、離子交換層析法 (ion exchange chromatography) 或親和層析法 (affinity chromatography)。

26.如申請專利範圍第 13 項所述之方法，係可在步驟 (a) 之前加入一預處理步驟以去除乳脂。

27.如申請專利範圍第 26 項所述之方法，其中前述之預處理步驟係包括一離心步驟。

28.如申請專利範圍第 13 項所述之方法，其中前述之乳汁為全乳、去脂乳或乳清。

29.如申請專利範圍第 13 項所述之方法，其中前述之動物為未經基因轉殖之動物或基因轉殖動物。

30.一種自動物乳汁中純化人類第九凝血因子之方法，至少包含下列步驟：

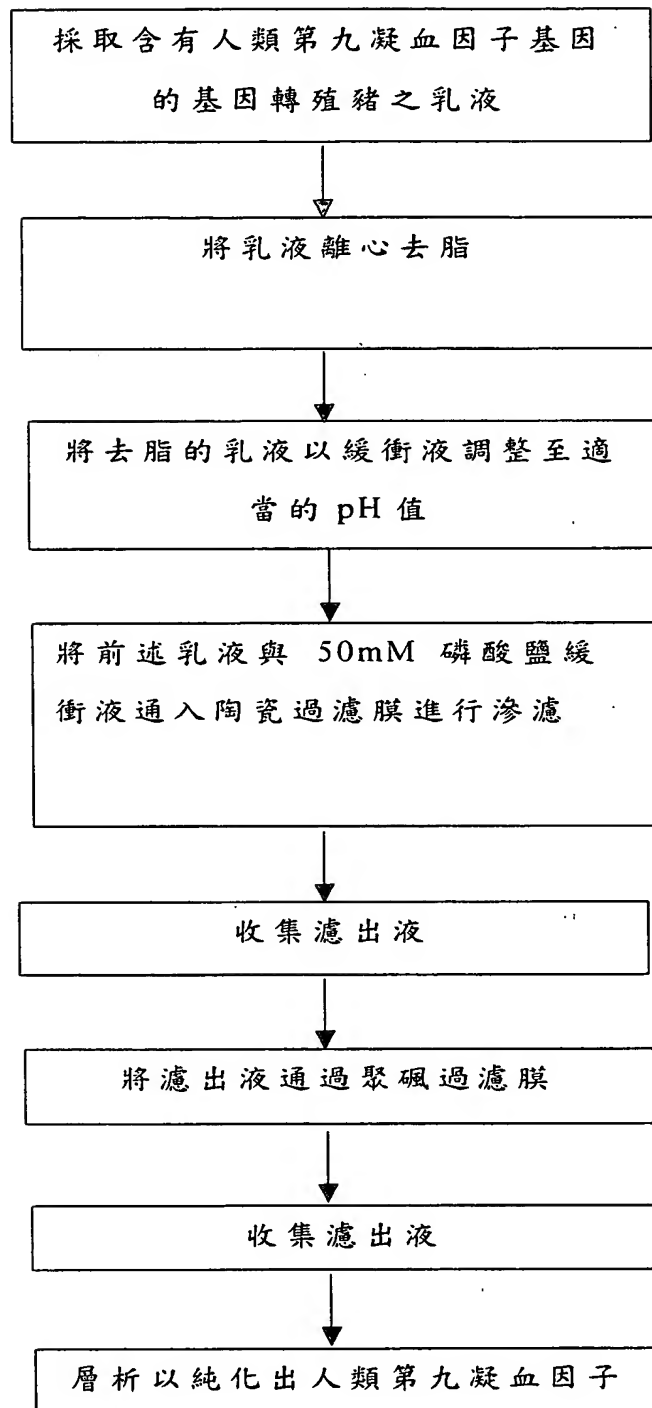
(a)將動物乳汁以緩衝溶液調至 pH 值 5.0 至 6.5；

(b)將(a)步驟所得之特定 pH 值之動物乳汁於 10 至 20 磅/平方英吋流速壓力下通過一陶瓷過濾膜，以分離乳汁中之酪蛋白並收集第一濾出液；以及

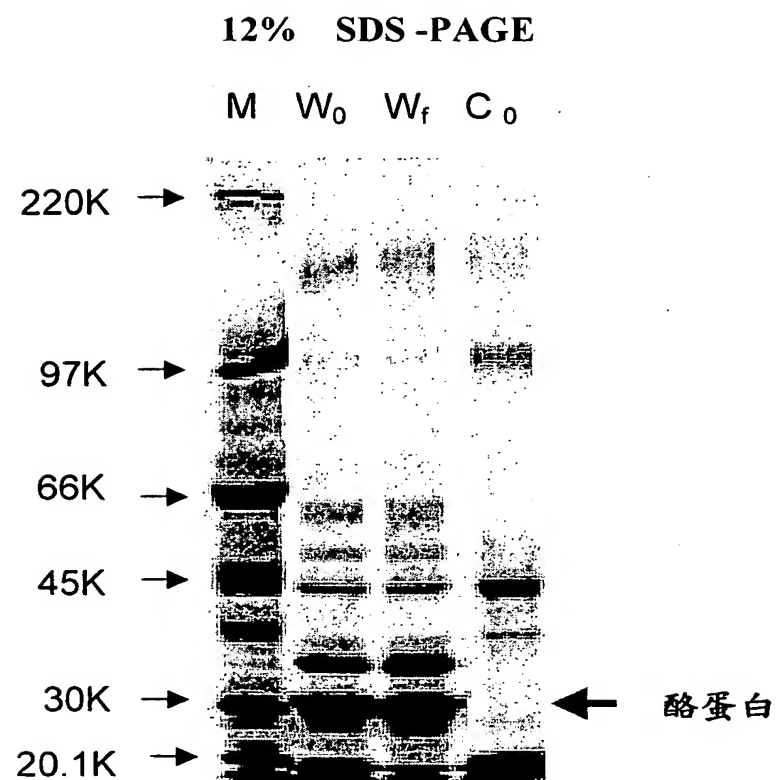
(c)將前述第一濾出液於 10 至 20 磅/平方英吋流速壓力與 pH 值 5.0 至 6.5 條件下通過聚砜過濾膜，以濃縮人類第九凝血因子並收集第二濾出液。

31.如申請專利範圍第 30 項所述之方法，係可在步驟 (a) 之前加入一離心步驟以去除乳脂。

32.如申請專利範圍第 30 項所述之方法，係可在步驟 (c) 之後加入層析步驟純化出人類第九凝血因子。

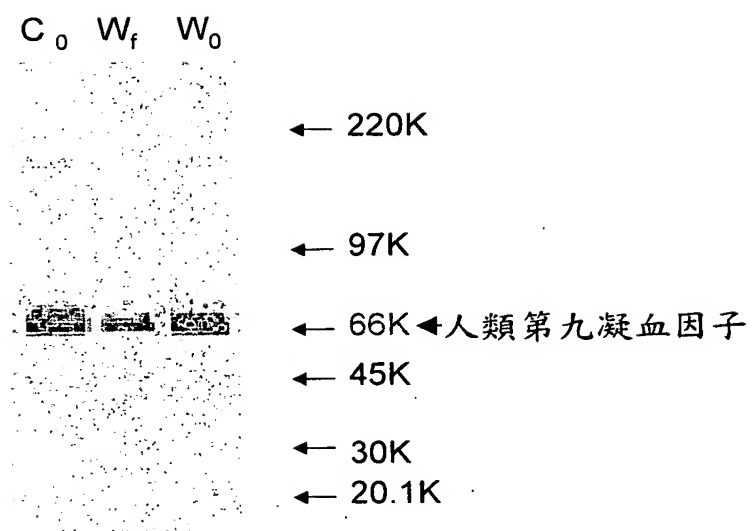


第一圖



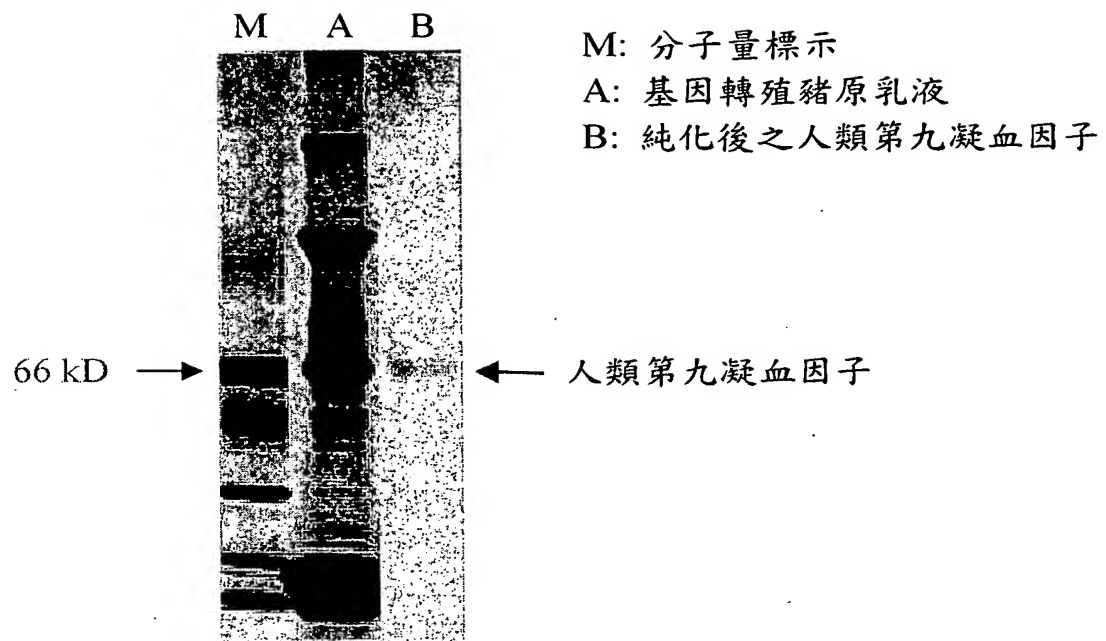
W_0 原乳液;
 W_f 未通過超過濾膜;
 C_0 通過超過濾膜的蛋白質組成

第二圖



W_0 原乳液;
 W_f 未通過超過濾膜;
 C_0 通過超過濾膜的蛋白質組成

第三圖



第四圖